

Rec'd PCT/PTO 04 MAR 2005



REC'D 16 OCT 2003

WIPO

PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
 einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 40 868.8  
**Anmeldetag:** 04. September 2002  
**Anmelder/Inhaber:** Artus – Gesellschaft für molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH, Hamburg/DE  
**Bezeichnung:** Verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren  
**IPC:** C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. August 2003  
 Deutsches Patent- und Markenamt  
 Der Präsident  
 Im Auftrag

Stromme

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4  
D - 22607 HAMBURG

Artus - Gesellschaft für  
molekularbiologische Diagnostik  
und Entwicklung mbH  
Nobistor 29

22767 Hamburg

J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)  
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS  
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE  
DIPL.-ING. ARNULF HUBER  
DR. ALLARD von KAMEKE  
DIPL.-BIOl. INGEBORG VOELKER  
DR. PETER FRANCK  
DR. GEORG BOTH  
DR. ULRICH-MARIA GROSS  
DR. HELMUT van HEESCH  
DR. JOHANNES AHME  
DR. HEINZ-PETER MUTH  
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU  
DR. BERND JANSEN  
DR. ALBRECHT von MENGES  
DR. MARTIN NOHLEN  
MÜNCHEN  
DIPL.-ING. LARS MANKE  
RECHTSANWALT IN HAMBURG  
DR. FRANK DETTMANN  
September 2002  
P 61145 ME/wo

Verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft verbesserte Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn<sup>2+</sup> unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von RNA, bei denen eine DNA als Matrize verwendet wird und eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach erzielt wird. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Kits, die für die Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren notwendigen Bestandteile umfassen.

Die Vermehrung von Nukleinsäuren in vitro ist für eine Vielzahl molekularbiologischer Verfahren, beispielsweise für die Klonierung, Sequenzanalyse, in vitro Expression, etc. erforderlich. Dementsprechend sind Verfahren entwickelt worden, mittels derer

Nukleinsäuren in vitro synthetisch hergestellt werden können. Die Verfahren lassen sich dabei im Allgemeinen durch das Reaktionsprodukt, DNA oder RNA, unterscheiden.

- 5 Die in vitro Transkription ist ein Verfahren zur Synthese von RNA üblicherweise ausgehend von einer doppelsträngigen DNA-Matrize. Dabei werden isolierte Bestandteile der zellulären Transkription (RNA-Polymerase und NTPs) für eine enzymatische Reaktion im Reagenzglas genutzt. Man geht dabei davon aus, dass das Substrat
- 10 für die Synthesereaktion ein Komplex aus  $Mg^{2+}$  und NTP ist.  $Mg^{2+}$  ist somit ein wichtiger Bestandteil der Reaktion und wird üblicherweise im Vergleich zu der NTP-Konzentration in einem Überschuss zugegeben (Milligan und Uhlenbeck, Methods in Enzymology, Vol. 180 (1989), 51-62; und Wyatt et al., Biotechniques, 15 Voll. 11 (1991), 764-769).

Zur Optimierung der Amplifikationsrate bei der in vitro Transkription schlägt die US 5,256,555 beispielsweise vor, die Nukleotide in einer Konzentration von insgesamt mehr als 16 mM 20 in die Reaktion einzusetzen. Gleichzeitig soll das für die Reaktion notwendige  $Mg^{2+}$  in einer Konzentration eingesetzt werden, die nicht mehr als 10 % oberhalb der Konzentration der Summe aller Nukleotide beträgt. Ferner soll anorganische Pyrophosphatase in der Reaktionsmischung vorliegen.

Das bekannteste Verfahren zur Synthese von DNA ist die Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction" oder PCR), welche Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis entwickelt wurde (vgl. Saiki et al., Science, Vol. 230 (1985), 1350-1354; und EP 201 184). 30

Bei der PCR-Reaktion lagern sich Einzelstrang-Primer (Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von üblicherweise 12 bis 24 Nukleotiden) an eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenz an. Die Primer werden mittels einer DNA-Polymerase und den 35 Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs, nämlich dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu einem Doppelstrang verlängert. Der Doppelstrang wird durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge aufgetrennt. Die

Temperatur wird so weit gesenkt, dass sich erneut Einzelstrang-Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern. Die Primer werden durch die DNA-Polymerase erneut zu einem Zweitstrang elongiert.

- 5 Bei Wiederholung der obigen Schritte ist eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-DNA-Stränge möglich, da die Reaktionsbedingungen so gewählt werden können, dass aus nahezu jedem DNA-Einzelstrang bei jedem Reaktionsdurchlauf ein Doppelstrang gebildet wird, der nachfolgend wieder in zwei Einzelstränge  
10 aufgespalten wird, welche wiederum als Matrize für weitere Stränge dienen.

Sofern vor diesem Verfahren eine reverse Transkription durchgeführt wird, bei der mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase  
15 ein DNA-Einzelstrang (die sogenannte cDNA) aus einer mRNA gebildet wird, kann die PCR-Reaktion auch unmittelbar auf die Vermehrung von Nukleinsäuren ausgehend von einer RNA-Sequenz anwendbar (vgl. EP 201 184).

- 20 Zu den genannten Reaktions-Grundschemata wurden eine Vielzahl von Alternativen entwickelt, die sich in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials (RNA, DNA, Einzelstränge, Doppelstränge) und des Reaktionsproduktes (Vermehrung spezifischer RNA- oder DNA-Sequenzen in einer Probe oder Vermehrung aller Sequenzen) voneinander unterscheiden.

Die DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschreiben beide Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren, welche eine Kombination aus einzelnen Schritten der PCR-Reaktion und einer  
30 Transkription umfassen.

Trotz der beschriebenen Fortschritte besteht nach wie vor ein Bedürfnis an verbesserten Verfahren zur Synthese von Nuklein-säuren, insbesondere an Verfahren, die eine hohe Syntheseleistung  
35 und -ausbeute bei einem geringen Verbrauch der Chemikalien ermöglichen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren gelöst, bei denen man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn<sup>2+</sup> unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, wobei die Bedingungen dadurch gekennzeichnet sind, dass diese ein Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Erfindungsgemäß wurde somit überraschenderweise festgestellt, dass eine deutlich verbesserte Syntheserate der Polymerase bereits durch die Auswahl des genannten Molverhältnisses von Mn<sup>2+</sup>/NTP erzielt werden kann. Gleichzeitig werden durch die geringere Konzentration der einzusetzenden NTPs Kosten gespart. Eine hohe Amplifikationsrate lässt sich somit auf einfache und kostengünstige Art und Weise erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Molverhältnis Mn<sup>2+</sup>/NTP" verwendet, um den Quotienten der molaren Konzentration des Mn<sup>2+</sup> im Verhältnis zur molaren Konzentration aller NTPs als Zahl darzustellen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren werden die Bedingungen für die Synthese des Nukleinsäurestranges so gewählt, dass das Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von 0,2 bis 0,6, vorzugsweise von 0,3 bis 0,5 beträgt.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Molverhältnisse beträgt die Gesamtkonzentration der NTPs vorzugsweise 4 bis 24mM; bei Verwendung vier verschiedener NTPs somit je 1 bis 6mM.

Daraus ergibt sich für Mn<sup>2+</sup> ein bevorzugter Konzentrationsbereich von 0,8 mM (Molverhältnis von 0,2 bei Konzentration der NTPs von 4mM) bis 14,4 mM (Molverhältnis von 0,6 bei Konzentration der NTPs von 24mM).

Als Polymerase kann in den erfindungsgemäßen Verfahren eine beliebige Polymerase eingesetzt werden, wobei die Verwendung von

RNA-Polymerasen, insbesondere einer T7 RNA-Polymerase, einer T3 RNA-Polymerase, oder einer SP6 RNA-Polymerase bevorzugt ist.

Bei der RNA-Polymerase kann es sich um eine RNA-abhängige oder  
5 DNA-abhängige Polymerase handeln. Die meisten der natürlichen  
DNA-abhängigen RNA-Polymerasen können auch RNA als  
Matrize erkennen, wenn eine geeignete Struktur vorliegt (vgl.  
Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 57 (1989), 423-431; und  
Konarska, M.M. und Sharp, P.A., Cell Vol. 63 (1990), 609-618).

10

Die Polymerase und die Nukleinsäure, die als Matrize dient,  
müssen zueinander passen. Die Nukleinsäure, die als Matrize für  
eine RNA-Polymerase dienen kann, muss beispielsweise Erkennungs-  
sequenzen oder Erkennungsstrukturen aufweisen, welche der RNA-  
15 Polymerase den Synthesestart ermöglichen. Vorzugsweise wird DNA  
als Matrize für die RNA-Polymerase eingesetzt. Entsprechende DNA  
kann eine Promotorregion enthalten, welche von der RNA-Polymerase  
erkannt und für den Synthesestart genutzt werden kann. Alternativ  
dazu kann die DNA eine Erkennungsstruktur ausbilden, welche es  
20 der RNA-Polymerase ermöglicht, die Synthese zu initiieren.  
Entsprechende Erkennungsstrukturen werden beispielsweise in Krupp  
(Nucleic Acids Res. Vol. 17 (1989), 3023-3036) und in Kuhn et al.  
(Nature Vol. 344 (1990), 559-562) beschrieben.

25 Da die erfindungsgemäßen Verfahren eine besonders hohe Amplifikationsrate ermöglichen, kann die Nukleinsäure, die als Matrize für  
die Polymerase eingesetzt wird, in sehr geringer Konzentration  
vorliegen. Die Matrize kann beispielsweise in Form von DNA oder  
mRNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm, bzw. 0,2  
30 attomol in einem Ansatz von 20 $\mu$ l, somit einer Konzentration von  
mindestens 10 femtomolar eingesetzt werden.

Der Reaktionsansatz muss NTPs enthalten, wobei bei Verwendung  
einer RNA-Polymerase üblicherweise ATP, UTP, CTP und GTP  
35 eingesetzt werden. Bei einer im Stand der Technik üblichen  
Transkription werden alle hier genannten NTPs in einem Reaktions-  
ansatz eingesetzt. Es kann jedoch auch wünschenswert oder

vorteilhaft sein, lediglich eines oder einige der NTPs einzusetzen.

- Alternativ oder zusätzlich zu den NTPs können bei Durchführung  
5 des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der RNA- oder  
DNA-Polymerase ferner dNTPs eingesetzt werden. Dieses Vorgehen  
weist den besonderen Vorteil auf, dass das Transkript vollständig  
oder teilweise DNA-Eigenschaften erhält, d.h. es wird Nuklease-  
resistent und bietet eine bessere Matrize für die RNA-Polymerase.  
10 Als dNTPs werden üblicherweise dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP  
eingesetzt.

- Alle oder einige der NTPs und/oder der dNTPs können als modifi-  
zierte Verbindung oder Derivate vorliegen. Im Stand der Technik  
15 übliche Derivatisierungen umfassen die Kopplung von Biotin oder  
eines Floureszenzmarkers, welche beispielsweise den Nachweis der  
Syntheseprodukte vereinfachen können.

- Die Reaktionszeit und weiteren Reaktionsbedingungen (Temperatur,  
20 pH-Wert, etc.) können vom Fachmann in Abhängigkeit der ver-  
wendeten Polymerase und der zu erzielenden Amplifikationsrate  
einfach gewählt werden. Die Inkubationszeit kann beispielsweise  
von 1 bis 24 Stunden, vorzugsweise von 4 bis 16 Stunden betragen.  
Bei Verwendung der T7-RNA-Polymerase bietet es sich an, die  
Reaktion in dem Bereich von 30°C bis 45°C durchzuführen.

- Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine überraschende  
Verbesserung der Amplifikationsrate. Im Rahmen der vorliegenden  
Anmeldung wird das Verhältnis der Menge synthetisch hergestellter  
30 Nukleinsäuren zu der Menge der ursprünglich vorliegenden Matrize  
als Amplifikationsrate bezeichnet. Das erfindungsgemäße Verfahren  
ermöglicht eine Amplifikationsrate von mindestens 1000, vor-  
zugsweise mindestens 2000. Bei optimalen Reaktionsbedingungen  
wurde sogar eine Amplifikationsrate von 2500 erzielt.

35

Die erfindungsgemäßen Verfahren können für eine Vielzahl von  
Zwecken zum Einsatz gelangen. Die verbesserten Verfahren zur

Herstellung von Nukleinsäuren können beispielsweise in den in DE 101 43 106.6 und DE 102 24 200.3 beschriebenen Verfahren zur Vermehrung von Ribonukleinsäuren eingesetzt werden. Die mittels der erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Nukleinsäuren können 5 als Sonden an einen Chip gebunden werden. Die Verfahren können für die *in vitro* Transkription, für die Untersuchung von Wechselwirkungen mit Nukleinsäurebindungs faktoren, als Aptamere zur spezifischen Bindung von Molekülen, als Ribozyme, etc. eingesetzt werden.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich Kits zur Synthese von Nukleinsäuren, die in einem oder mehreren Behältern eine Polymerase, NTPs, dNTPs und/oder deren Derivate (beispielsweise biotinylierte oder mit Floureszenzmarkern gekoppelte NTPs oder 15 dNTPs) und Mn<sup>2+</sup> umfassen. Bei der Polymerase handelt es sich vorzugsweise um eine RNA-Polymerase, wobei die Verwendung der T7 RNA-Polymerase, der T3 RNA-Polymerase oder der SP6 RNA-Polymerase besonders bevorzugt ist.

20 Entsprechende Kits enthalten ferner vorzugsweise eine Anweisung zur Durchführung eines der erfindungsgemäßen Verfahren. In entsprechenden Anweisungen oder Handbüchern wird genau beschrieben, in welcher Menge die einzelnen Bestandteile der Reaktion miteinander vermischt werden müssen, um optimale Syntheseleistungen zu erhalten.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

30

Fig. 1 In vitro Transkription unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>; Bestimmung des optimalen Verhältnisses Mn<sup>2+</sup>/NTPs und Vergleich mit Mg<sup>2+</sup>.

Fig. 2 Bestimmung der optimalen NTP-Konzentration bei verschiedenen Mn/NTP-Verhältnissen.

Fig. 3 Bestimmung der Amplifikationsrate

5

Beispiel 1

10 In diesem Beispiel wurde die Transkriptionsleistung der RNA-Polymerase in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von  $Mn^{2+}$  sowie  $Mg^{2+}$  ermittelt.

15 Dafür wurde in einem Reaktionsansatz 20  $\mu$ l, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM DTT, 2 mM Spermidin, 0,01% Triton X-100, 10 ng Nukleinsäure Matrize (Plasmid pTRI-Xef), 10 U RNasin- (RNase-Inhibitor), 40 U T7 RNA-Polymerase, 4 mM NTPs (jedes; ergibt gesamt 16 mM) und  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  in einer Konzentration von 4 mM bis 10 mM zusammen pipettiert und für 16 Stunden inkubiert.

20 Aliquote Teilmengen von 5  $\mu$ l wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid photographiert. Das Ergebnis ist in Fig. 1 dargestellt. In Abhängigkeit der Konzentration des  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  ergibt sich ein Verhältnis aus  $Mn^{2+}/NTPs$  von 0,25 bis 0,625.

Fig. 1 zeigt eindeutig, dass die Gegenwart von  $Mn^{2+}$  im Vergleich zu der Gegenwart von  $Mg^{2+}$  in allen Versuchsansätzen eine bessere Amplifikationsrate erzielte.

30

Beispiel 2

Das Ziel dieses Beispiels bestand darin, die optimale NTP-Konzentration in Abhängigkeit des Mn/NTP-Verhältnisses zu ermitteln.

Zu diesem Zweck wurden Reihen von Versuchsansätzen für die in vitro-Transkription wie in Beispiel 1 erstellt. Die Konzentration der einzelnen NTPs betrug dabei von 2 mM bis 10 mM und die Konzentration des MnCl<sub>2</sub> betrug von 2,4 mM bis 24 mM. Daraus ergeben sich Verhältnisse von Mn/NTP von 0,3 bis 0,6.

Die durch die Transkription erhaltene Menge an Transkript (in ng) wurde durch Ethidiumbromidfärbung des Gels und einer RNA-Verdünnungsreihe als Standard im Gel bestimmt.

10

Das Ergebnis ist in Fig. 2 zusammengefasst und zeigt, daß bereits bei einer Konzentration von 4 mM je NTP (gesamt also 16 mM) eine maximale Syntheserate erbrachten. Die besten Ergebnisse wurden bei der Kombination von 4 mM je NTP und 6,4 mM MnCl<sub>2</sub> erhalten (entspricht einem Verhältnis von 0,4).

### Beispiel 3

20 In diesem Beispiel wurde die Amplifikationsrate der in vitro-Transkription in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Dafür wurde zunächst eine in vitro-Transkriptionsreaktion wie in Beispiel 1 beschrieben erstellt, wobei 4,8 mM MnCl<sub>2</sub> und 4 mM NTP (Summe 16 mM) eingesetzt wurden (entspricht einem Verhältnis von 0,3).

Zu den in Fig. 3 genannten Zeiten wurden je 5 µl entnommen und auf einem 1 % nativen Agarosegel analysiert. Die Ergebnisse werden in Fig. 3 gezeigt und lassen erkennen, dass in allen Reaktionsansätzen ein Amplifikationsfaktor von mehr als 1500 erzielt wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von Nukleinsäuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und Mn<sup>2+</sup> unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nukleinsäurestranges ermöglichen, dadurch gekennzeichnet, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von nicht mehr als 0,7 umfassen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine RNA-Polymerase ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Molverhältnis von Mn<sup>2+</sup>/NTP von 0,2 bis 0,6 beträgt, vorzugsweise 0,3 bis 0,5.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Gesamtkonzentration der NTPs 4 bis 24mM beträgt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Mn<sup>2+</sup> mindestens 3mM, vorzugsweise mindestens 3,5mM oder mindestens 4mM beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Konzentration des Mn<sup>2+</sup> von 4 bis 17 mM beträgt.
7. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem man als Polymerase eine T7 RNA-Polymerase, eine T3 RNA-Polymerase, oder eine SP6 RNA-Polymerase einsetzt.
8. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem man als Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, DNA oder RNA einsetzt.

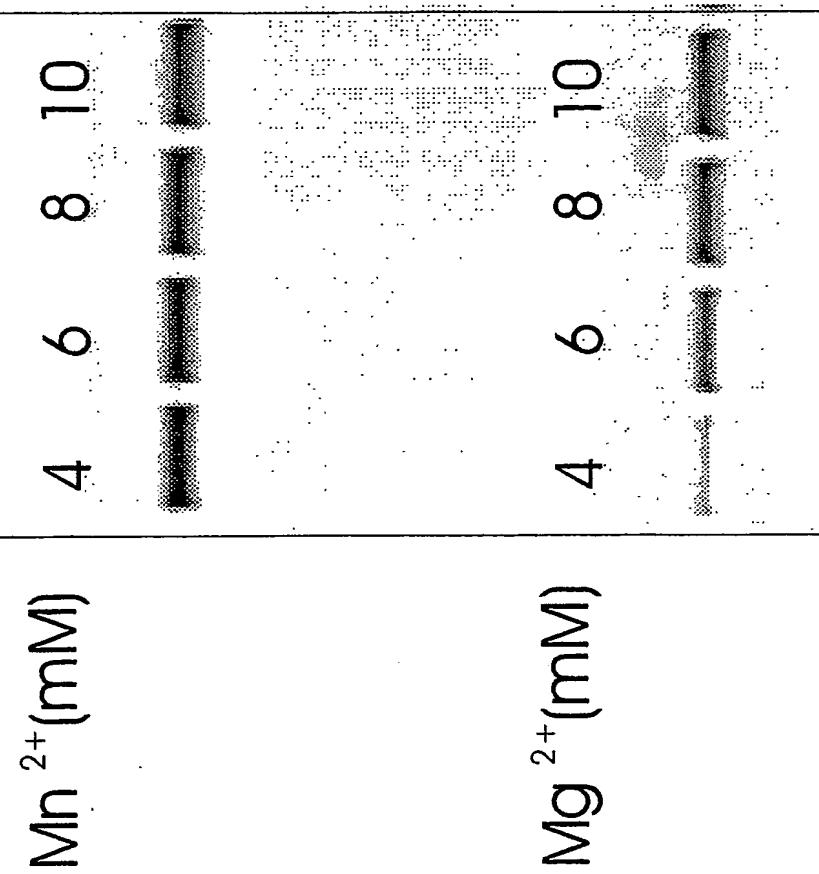
9. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Nukleinsäure, die als Matrize für die RNA-Polymerase dienen kann, RNA oder DNA in einer Menge von mindestens 0,1 picogramm (bzw. 0,2 attomol) oder einer Konzentration von mindestens 10 femtomolar vorliegt.
10. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs eingesetzt werden.
11. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ferner dNTPs eingesetzt werden.
12. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs eingesetzt werden.
13. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Floureszenzmarker-gekoppelte Derivate, eingesetzt werden.
14. Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, bei dem eine Amplifikationsrate von mindestens 1000-fach, vorzugsweise mindestens 2000-fach, erzielt wird.
15. Kit zur Synthese von Nukleinsäuren, das in einem Behälter oder in mehreren getrennten Behältern eine Polymerase, NTPs und Mn<sup>2+</sup> umfasst.
16. Kit gemäß Anspruch 15, in dem die RNA-Polymerase als T7 RNA-Polymerase, T3 RNA-Polymerase, oder SP6 RNA-Polymerase vorliegt.
17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, in dem ATP, UTP, CTP und/oder GTP als NTPs vorliegen.

18. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, in dem ferner dNTPs vorliegen.
19. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, in dem dATP, dTTP, dCTP und/oder dGTP als dNTPs vorliegen.
20. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19, in dem die NTPs oder dNTPs als Derivate, beispielsweise als biotinylierte oder mit einem Floureszenzmarker-gekoppelte Derivate, vorliegen.
21. Kit gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, das ferner eine Anweisung zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Nuklein-säuren, bei dem man eine Polymerase, eine Nukleinsäure, die als Matrize für die Polymerase dienen kann, NTPs und  $Mn^{2+}$  unter Bedingungen inkubiert, welche die Synthese eines Nuklein-säurestranges ermöglichen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die Bedingungen ein Molverhältnis von  $Mn^{2+}/NTP$  von nicht mehr als 0,7 umfassen.

Figur 1



BEST AVAILABLE COPY

Figure 2

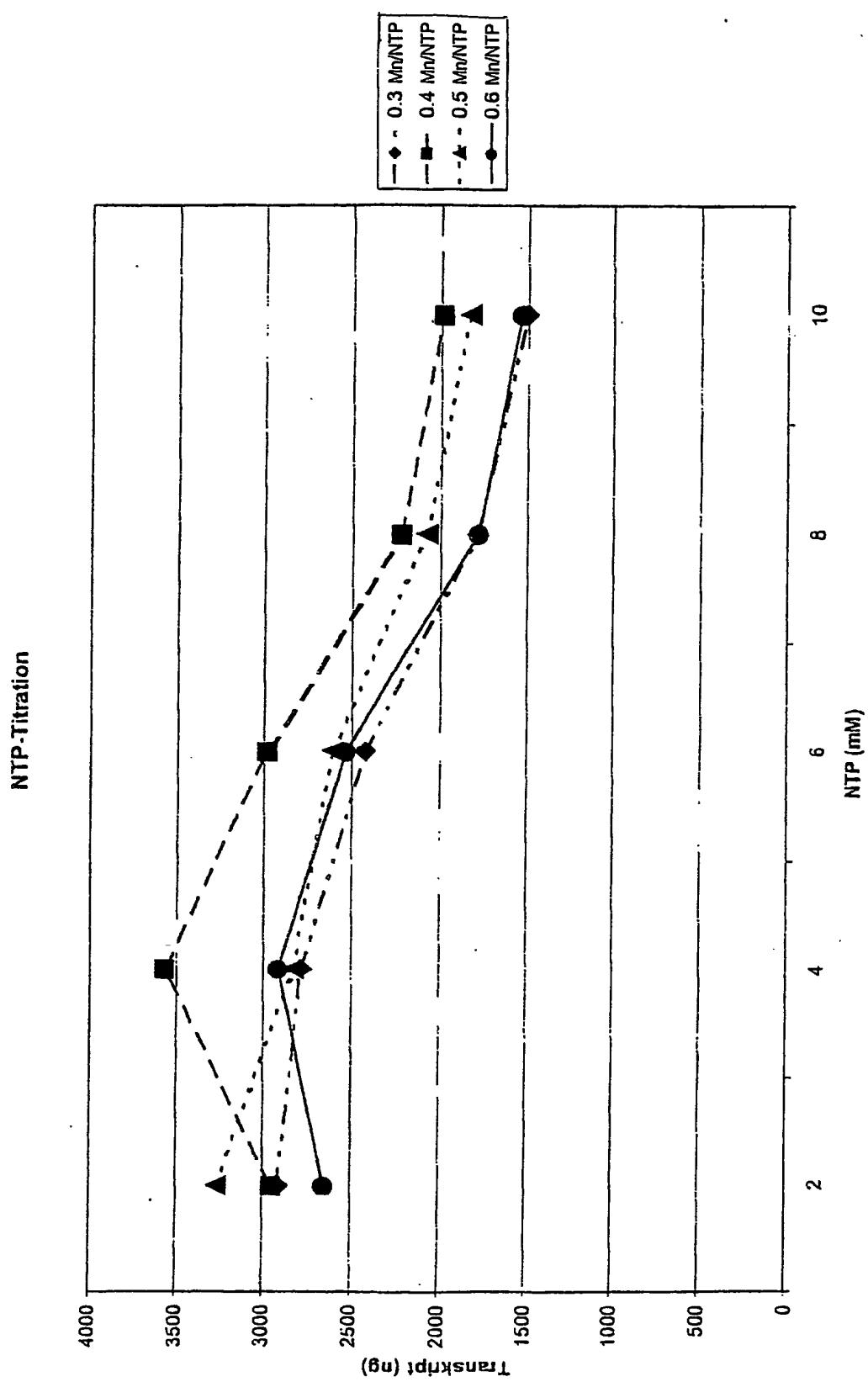


Figure 3

